

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：30-14

課題名：小児白血病/リンパ腫の発症や予後に関係する融合遺伝子のパートナー遺伝子検出・診断法の開発

主任研究者名（所属施設） 国立成育医療研究センター研究所
（所属・職名） 小児血液・腫瘍研究部分子病理研究室 室長

（研究成果の要約）治療標的やリスクの層別化に関わる融合遺伝子や遺伝子変異、および近年新たに見出されてきた融合遺伝子や遺伝子変異を検出するために 42 遺伝子のカスタムプローブパネルを設計後、Ph-ALL 及び、Ph-like ALL 症例で認められる *ABL1*, *JAK2*, *CRLF2* 関連融合遺伝子陽性の ALL 症例、多数のパートナー遺伝子が存在し、検出が困難な *MLL* 関連融合遺伝子陽性の ALL 症例、近年既存の primary driver 遺伝子異常を認めない疾患群から同定されてきた *ZNF384*, *MEF2D*, *DUX4*, *ETV6*, *ERG*, *PAX5* 遺伝子に関連した融合遺伝子陽性の ALL/リンパ腫、合計 30 症例と、*ABL1*, *MLL*, *ETV6*, *TCF3* 遺伝子に関連した融合遺伝子を有する白血病細胞の細胞株 10 株から RNA を抽出し、RNA target capture sequencing 解析を行うとともに、既存の遺伝子異常を迅速、高感度に検出するための条件検討を行った。同定された異常について、サンガー法による確認を行い、*ABL1*, *CRLF2*, *ZNF384*, *MEF2D*, *DUX4*, *ETV6*, *TCF3*, *PAX5* 関連の既知融合遺伝子を迅速に検出する解析法が開発できた。*JAK2*, *MLL* 関連の既知融合遺伝子を検出するためのカスタムプローブパネルの再設計するとともに、次年度に既存の診断時解析で遺伝子異常を検出できなかった症例を対象とした解析を行い、今後の臨床試験に利用できるように、急性白血病/リンパ腫の診断アルゴリズムを確立するための準備に着手した。

1. 研究目的

急性白血病/リンパ腫は、種々の複合的遺伝子異常によって生ずる、多様な疾患群である。急性リンパ芽球性白血病/リンパ腫（ALL/LBL）と成熟 B リンパ腫のそれぞれの病型の中に、発症の主要原因と考えられる遺伝子異常（主に融合遺伝子や染色体数の異常等）によって、白血病細胞の生物学的特性や臨床特性が規定される様々な疾患 entity を含む。例えば、B 前駆細胞性 ALL（BCP-ALL）は、B 細胞系に特異的な抗原発現を示す細胞マーカー所見上の共通の特徴によって診断、分類されている。その中で、*BCR-ABL1* 陽性の Ph1-ALL や *ABL1*, *ABL2*, *PDGFRB* 関連融合遺伝子が陽性の Ph-like ALL の場合は、初発時末梢血白血球数が高く通常の化学療法に抵抗性を示す症例が多い

が、チロシンキナーゼ阻害剤が有効であるという特徴を有する。*ETV6-RUNX1* 陽性症例の場合は化学療法に対する治療反応性が良く予後良好である症例が多い。また近年の網羅的遺伝子解析により、見出されてきた *DUX4* 関連融合遺伝子や *EP300-ZNF384* 融合遺伝子陽性症例は年長児に多く、予後良好である症例が多い。以上のように、白血病/リンパ腫の発症に関わる遺伝子異常について、それぞれの臨床特性についての知見が集積されており、現在、治療標的となる遺伝子異常やリスクの層別化に利用可能な遺伝子を検出する方法とアルゴリズムの整備が急務となっている。

本研究の目的は、小児急性白血病/リンパ腫において、治療標的やリスクの層別化に

関わる融合遺伝子や遺伝子変異や近年新たに見出されてきた融合遺伝子や遺伝子変異、等について、カスタムプローブパネルを設計後、次世代シーケンサーを用いて、既存の RT-PCR や FISH に比べて、迅速かつ高感度に遺伝子異常を検出するための解析法を開発し、今後の臨床試験に利用するための診断アルゴリズムを確立することである。平成 30 年度は既存の遺伝子異常が同定されている症例を対象として解析を行い、パネルシーケンス解析法の開発を行い、次年度以降、既存の診断時解析で遺伝子異常を検出できなかった症例を対象として解析を行い、今後の臨床試験に利用できるように、急性白血病/リンパ腫の診断アルゴリズムを確立することを目指す。

将来的には JPLSG の疾患委員会と協力して、臨床情報と統合的に解析し、治療層別化への応用を目指す。

2. 研究組織

研究者	所属施設
大木 健太郎	小児血液・腫瘍研究部
研究協力者	
清河 信敬	小児血液・腫瘍研究部
渡部 悟	小児血液・腫瘍研究部
田村 沙亜希	小児血液・腫瘍研究部

3. 研究成果

本年度の研究では、解析対象の遺伝子異常を検出するためのカスタムプローブパネルを設計後、既存の遺伝子異常が同定されている症例を対象として、RNA target capture sequencing 解析を行い、既存の遺伝子異常を迅速、高感度に検出するための条件検討を行った。解析結果から、最適なカスタムプローブや条件を決定し、新規診断法の開発を図った

1) カスタムプローブパネルの設計

近年新規の予後因子として同定され、分子標的薬が存在する Ph-like ALL に関わる Tyrosin Kinase 関連遺伝子や融合遺伝子として多数のパートナー

遺伝子が存在し、検出が困難な *MLL* 遺伝子、近年既存の primary driver 遺伝子異常を認めない疾患群から同定されてきた融合遺伝子として、*ZNF384*、*MEF2D*、*DUX4*、*ETV6*、*ERG*、*IgH*、*MYC*等の合計 42 遺伝子を検出するためのプローブパネルをカスタム設計した。

2) 次世代シーケンサーを用いた RNA target capture sequencing 解析法の開発

「JPLSG における小児血液腫瘍性疾患を対象とした前方視的研究」において、検体の研究利用についてインフォームドコンセントが得られ、検体が保存されている症例で、1) Ph-ALL 及び、Ph-like ALL 症例として、*ABL1*、*JAK2*、*CRLF2* 関連融合遺伝子陽性 ALL 症例、2) 多数のパートナー遺伝子が存在し、検出が困難な *MLL* 関連融合遺伝子が疑われる ALL 症例、3) 近年既存の primary driver 遺伝子異常を認めない疾患群から同定されてきた融合遺伝子として、*ZNF384*、*MEF2D*、*DUX4*、*ETV6*、*ERG*、*PAX5* 等の関連した融合遺伝子がすでに判明している ALL/リンパ腫 30 症例の RNA の保存検体を JPLSG 検体保存センターから分与を受けるとともに、*ABL1*、*MLL*、*ETV6*、*TCF3*等の関連した融合遺伝子を有する白血病細胞の細胞株 10 株から RNA を抽出後、設計したカスタムプローブパネルを利用し、既存の遺伝子異常を有する RNA40 検体を用い、RNA target capture sequencing 解析を行うとともに、既存の遺伝子異常を迅速、高感度に検出するための条件検討を行った。同定された異常について、サンガー法による確認を行い、*ABL1*、*CRLF2*、*ZNF384*、*MEF2D*、*DUX4*、*ETV6*、*TCF3*、*PAX5* 関連の既知融合遺伝子を迅速に検出する解析法が開発できた。一方で、*JAK2*、*MLL* 関連の既知融合遺伝子は繰り返し条件検討を行ったが検出できず、両遺伝子については、カスタムプローブパネルの再設計に着手した。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究では、中央診断後の余剰検体を利用した検体研究であり、生年月日を含め、個人の特定に結びつく情報は取り扱わなかった。また、TCCSG 番号やJPLSG 番号と患者個人情報との照合表は該当する症例の診療施設で管理されており、研究者あるいは、研究実施施設で保持することはないため、試料の提供者が社会的不利益を受ける可能性は極めて低いと考えられるが、個人情報の保護に最新の注意を払い、検体を提供することによる不利益・危険性を排除するための最大限の努力を行った。本研究では、東京小児がん研究会 (TCCSG) 臨床研究、および日本小児がん研究グループ血液腫瘍分科会 (JPLSG) 疫学研究において、すでに研究利用の同意が得られた保存試料を対象とするため、あらためて同意を取得し直すことは無いが、本研究の実施、およびその内容について、以下の方法で情報を公開し、対象者に本研究における自身の試料の使用を拒否する機会を提供した。1) TCCSG、および JCCG ホームページおよび研究責任者の所属する施設のホームページ上で情報を公開した。2) 研究責任者や分担研究者の所属施設の病院外来に 1) と同内容のポスターを掲示した。

本研究の遂行においては、ヘルシンキ宣言を遵守し、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成26年12月22日制定)」を順守して行った。全ての研究は、成育で外部委員を含めた倫理審査委員会において、その科学性ならびに倫理性についての審査を受け、同委員会の承認ならびに実施機関の長の許可を得て実施した。成育においては、受付番号 1403「特徴的な細胞マーカー所見を示す白血病症例に対する網羅的遺伝子解析研究」、他、本件に関わる申請として 13 件について、倫理承認済みであり、さらに 2 件の新規申請が承認された。